Zur Wirkung von Aescin und Benzaron auf die durch Polidocanol und Etacrynsäure geschädigten isolierten Pfortadern und Aorten der Ratte

Hans-Jürgen Backhaus

1981

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
München
Direktor: Prof. Dr. W. Forth

Zur Wirkung von Aescin und Benzaron auf die durch Polidocanol und Etacrynsäure geschädigten isolierten Pfortadern und Aorten der Ratte.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Humanmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Jürgen Backhaus
aus München
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Felix
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Forth
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1981

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Material und Methoden	5
Ergebnisse	
Etacrynsäure	9
Aescin	11
Benzaron	16
Diskussion	
Etacrynsäure	20
Aescin	23
Benzaron	27
Literaturverzeichnis	30

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0036

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von Etacrynsäure, Aescin und Benzaron auf die Kontraktilität isolierter Gefäßstreifen (Ratte) untersucht. Die Auslösung der Kontraktionen erfolgte durch Gabe standardisierter Noradrenalinkonzentrationen.

Dabei zeigte sich, daß Etacrynsäure dosisabhängig eine irreversible Schädigung hervorruft. Bei einer Konzentration von 0,001 % im Gefäßbad zeigte sich keine Veränderung, bei 0,01 % wurde eine mäßige Kontraktionshemmung sichtbar und bei 0,05 % kam es zu einem völligen Sistieren der Kontraktionen. Die Irreversibilität dieser Schädigung äußerte sich in einer Zunahme der Kontraktionshemmung im Laufe der Erholungszeit nach Entfernen von Etacrynsäure aus dem Gefäßbad. Es wird angenommen, daß diese Schädigung teilweise Ausdruck einer Enzymhemmung, teilweise Ausdruck einer Störung des Zellgefüges ist.

Die Applikation von Aescin erfolgte einerseits direkt in das Gefäßbad, andererseits durch intraperitoneale Injektion eine halbe und 18 Stunden vor Tötung der Tiere. Es wurde eine dosisabhängige protektive Schutzwirkung in vitro und in vivo deutlich, wobei der Zeitpunkt der intraperitonealen Gabe keinen Einfluß hatte. Der Bereich der optimalen Dosis lag zwischen 0,00025 % und 0,0005 %. Ab einer Konzentration von 0,001 % traten nach der Applikation von Aescin regelmäßig Kontraktionen auf. Eine zusätzliche Schädigung zeigte sich ab einer Konzentration von 0,005 %. Die Aescinwirkung kann als membranabdichtender bzw. -stabilisierender Effekt erklärt werden oder/und als Steigerung der Kontraktionsbereitschaft durch Erhöhung der $PGF_{2\alpha}$-Produktion und -Ausschüttung.

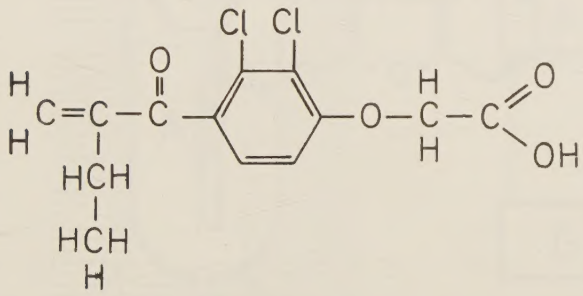
Benzaron in einer Konzentration von 0,00001 % ver-

mochte nicht die Schädigung durch Polidocanol aufzuheben und die Kontraktilität zu verbessern. Eine Inkubation der Gefäße nur mit Benzaron in einer Konzentration von 0,001 % hatte sogar eine leichte Kontraktionshemmung zur Folge. Eine unterschiedliche Behandlungsdauer (20, 40 und 60 Minuten) erbrachte gleiche Ergebnisse. Nach Erhöhung der Konzentration auf 0,01 % sistierten die Kontraktionen fast vollständig. Diese kontraktionshemmende Wirkung scheint nicht durch eine "Antagonisierung" von Calcium oder Noradrenalin verursacht zu sein, sondern es ist eher anzunehmen, daß Benzaron direkt die kontraktilen Strukturen der glatten Gefäßmuskeln angreift.

Einleitung

Der therapeutisch angestrebten Wirkung eines Pharmakons auf ein Organ stehen Nebenwirkungen an anderen Organen gegenüber, die erwünscht oder unerwünscht sein können. Das Blut als Transportmittel und das Gefäßsystem als Transportweg sind vor allem anderen dem Einfluß einer pharmakologischen Substanz ausgesetzt. Die Frage, inwieweit die Kontraktilität glatter Gefäßmuskeln durch die unten beschriebenen Medikamente verändert wird, ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Die aus der Klinik bekannte Erfahrung, daß Etacrynsäure[1)] bei zu schneller intravenöser Injektion eine Venenwandreizung hervorrufen kann, führte zu der Überlegung, ob auch die Kontraktionsbereitschaft der Gefäße beeinträchtigt wird. Etacrynsäure ist ein ungesättigtes Keton-Derivat der Aryloxyessigsäure:



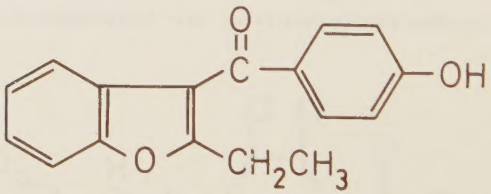
Die Substanz ist schwach wasserlöslich (als Natriumsalz bis zu einer Konzentration von 9 %), jedoch leicht

1) Hydromedin, Sharp & Dohme

löslich in verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Anders als bei Etacrynsäure ist eine Wirkung von Aescin auf die Gefäßwand schon lange bekannt. Diese wurde als "tonisierend" und "ödemhemmend" beschrieben. Aescin[1], ein Triterpenglykosid, gehört zu den Inhaltsstoffen des Samens von Aesculus hippocastanum L.. Als Saponin zeichnet es sich durch Grenzflächenaktivität aus.

Auch dem Benzaron wird eine antiödematöse Wirkung zugeschrieben. Es brachte beim experimentell erzeugten Ödem der Katzenpfote gute Ergebnisse. Daher lag es nahe, diese Substanz auch an isolierten Gefäßstreifen zu testen. Ein zusätzlicher Angriffspunkt bei der therapeutischen Anwendung ist die Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes. Chemisch wird Benzaron[2] von den 3-Benzoyl-benzofuranen abgeleitet:



1) Reparil®, Madaus 2) Fragivix®, Sanol Schwarz

Material und Methoden

Die vorliegenden Versuche wurden an isolierten Gefäßstreifen von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Gewicht zwischen 300 g und 400 g) durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Genickschlag. Die Vena portae und gelegentlich auch die Aorta thoracica wurden herauspräpariert und spiralig aufgeschnitten (1). Die Länge der Präparate lag zwischen 10 mm und 20 mm Vene bzw. 25 mm und 35 mm Aorta.

Versuchsanordnung:

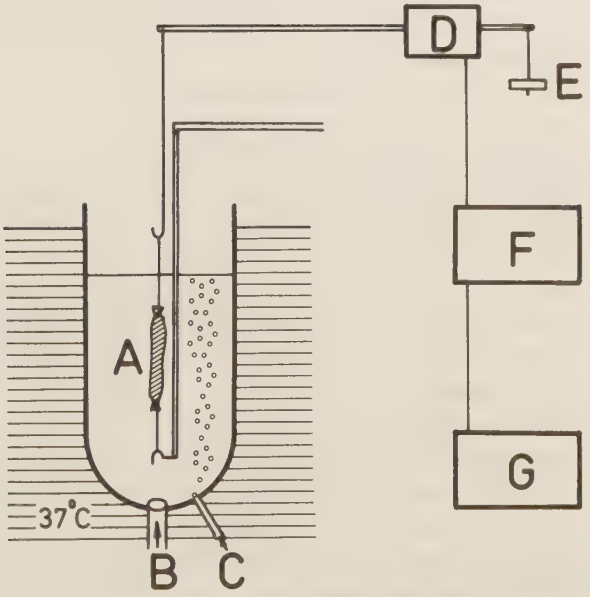


Abb. 1 : Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. A = Gefäßstreifen, B = Zulauf für frische Krebs-Henseleit-Lösung, C = Begasung mit Carbogen, D = Hebelachse mit Photowiderständen, E = Gewicht, F = Gleichstrombrücke, G = Schreiber

In einem Gefäßbad befanden sich circa 22 ml 37° C warme Krebs-Henseleit-Lösung, die mit Carbogen begast wurde. Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung:

NaCl	122,0	mMol/l
KCl	4,73	"
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	3,29	"
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	1,19	"
$NaHCO_3$	15,5	"
KH_2PO_4	1,19	"
Glukose . H_2O	11,5	"

In diese Lösung, die bei Bedarf erneuert werden konnte, kamen nun die vorbereiteten Gefäßstreifen. Die isotone Messung der Längenänderung der Präparate wurde fortlaufend registriert. Eine Kontraktion bewegte einen widerstandsfrei gelagerten Hebel, der auf der einen Seite mit dem Gefäßstreifen verbunden war und auf der anderen Seite ein Gewicht trug (Vena portae 700 mg, Aorta 1500 mg). Beidseits der Achse hatte der Hebel je eine Blende, welche dahinterliegende, beleuchtete Photowiderstände teilweise abdeckte. Eine Auslenkung bewirkte ein Freigeben des einen und ein Abdecken des anderen Widerstands. Durch Einschaltung einer Gleichstrombrücke[1] zeigte der Schreiber Verkürzungen oder Erschlaffungen des Präparates linear an.

Substanzen:

zur Messung der Kontraktilität:

Noradrenalin[2] (NA)

zur Schädigung der Gefäßstreifen:

Polidocanol[3]

Etacrynsäure

zur Testung auf eine protektive Wirkung:

Aescin

Benzaron

---

1) Filbig KG München 2) Merck 3) Aethoxysklerol^R, Kreussler

Versuchsreihen bei Aescin:

1. Reihe: Schädigung der Gefäßstreifen mit Polidocanol

2. Reihe: Schädigung der Gefäßstreifen mit Etacrynsäure.

Beide Versuchsreihen gliederten sich in eine Kontrollgruppe und in eine oder mehrere Versuchsgruppen mit einer oder mehreren Konzentrationen von Aescin.

Versuchsablauf:

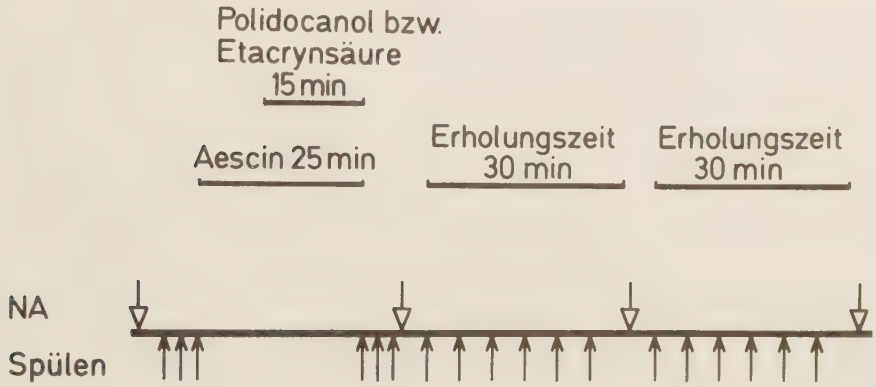


Abb. 2 : Standardisierter Versuchsablauf

Nach der Präparation blieben die Venenstreifen eine Stunde unberührt im Gefäßbad. Um eine maximale Kontraktion zu erreichen wurde NA in kumulativen Konzentrationen (von 10^{-8} bis 5 x 10^{-6} Mol im Gefäßbad) gegeben und anschließend wieder mit frischer Krebs-Henseleit-Lösung ausgespült. Die kumulativen NA-Gaben betrugen bei den Aortenstreifen 10^{-9} bis 10^{-4} Mol. Bei den Kontrollgruppen wurden nun die schädigenden Substanzen zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Nach Ausspülen dieser Substanzen wurde das Ausmaß der Schädigung durch Gabe von NA in den oben erwähnten kumulativen Konzentrationen festgestellt.

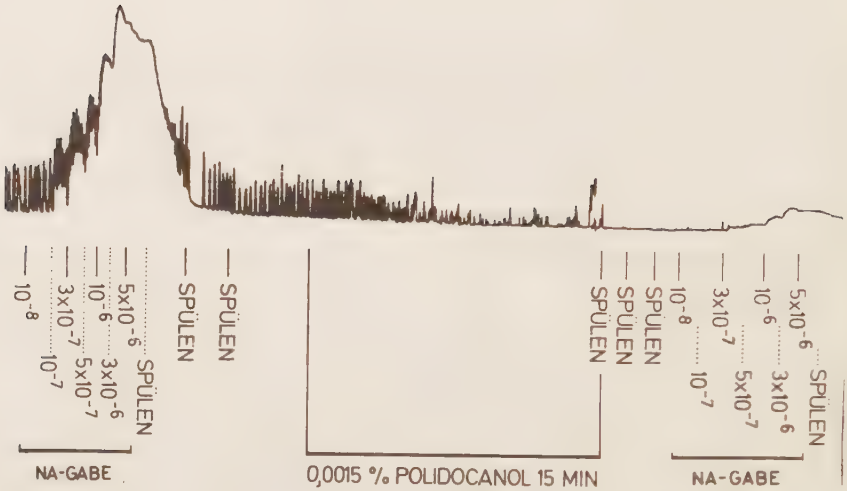


Abb. 3 : Kontraktionen eines Präparates nach kumulativer NA-Gabe am Beispiel einer Originalkurve.

Daraufhin folgte eine Erholungszeit von 30 Minuten mit mehrfachem Spülen. Nach Ablauf dieser Erholungszeit wurde erneut NA appliziert. Dieser Vorgang (30 Minuten Erholungszeit mit anschließender NA-Gabe) wiederholte sich noch ein- oder zweimal. In den Versuchsgruppen erhielten die Organe 10 Minuten vor Applikation der schädigenden Substanz das zu testende Pharmakon.

Auswertung:

Als Bezugsgröße wurde die maximale Kontraktion nach der ersten NA-Gabe festgelegt und gleich 100 % gesetzt. Alle weiteren Kontraktionen werden in Relation zu dieser "maximalen Anfangskontraktion" ebenfalls in Prozent ausgedrückt. Der Einfluß der protektiven Substanzen konnte an der unterschiedlichen Größe der Kontraktion vor und nach der Schädigung erkannt werden. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben.

Ergebnisse

Etacrynsäure

Bei einer konstanten Einwirkungszeit von 15 Minuten wurden drei verschiedene Etacrynsäurekonzentrationen untersucht.

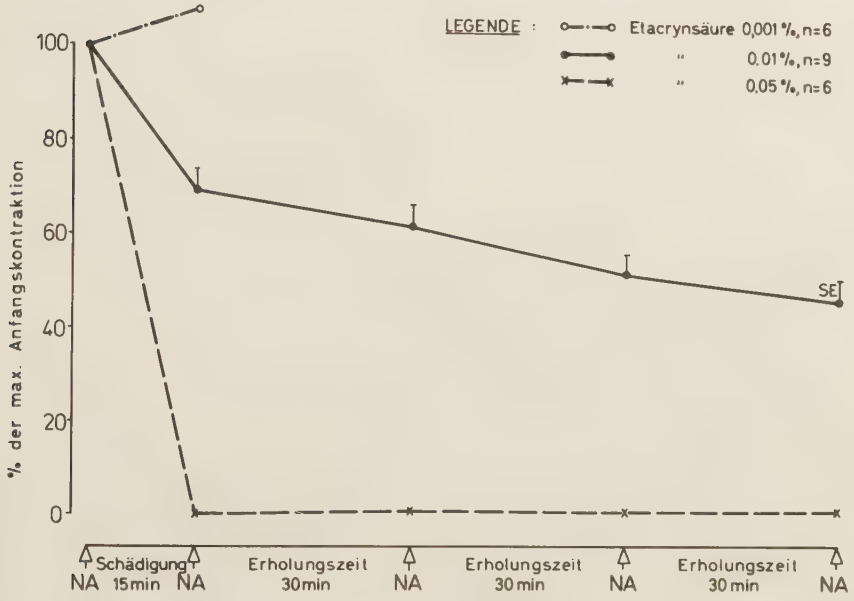


Abb. 4 : Veränderung der maximalen Kontraktion nach Schädigung von Venenstreifen der Ratte mit Etacrynsäure in verschiedenen Konzentrationen und Entwicklung im Verlauf der Erholungszeit.

Nachdem sich bei einer Etacrynsäurekonzentration von 0,001 % im Gefäßbad noch keine Schädigung nachweisen ließ, zeigte sich nach der anschließenden Erhöhung der Konzentration auf 0,05 % ein völliges

Sistieren sowohl der Spontanaktivität als auch der Reaktion auf NA. Da sich auch nach öfterem Spülen bei einer Erholungszeit von 3 x 30 Minuten keine Kontraktion auf NA mehr zeigte, mußte eine vollständige und irreversible Schädigung angenommen werden. Eine dazwischenliegende Konzentration von 0,01 % Etacrynsäure bewirkte eine Reduktion der maximalen Kontraktion auf 69 %. Nach einer eineinhalbstündigen Erholungszeit sank diese weiterhin ab auf einen Wert von 46 %. Dies spricht dafür, daß auch bei dieser Konzentration eine mäßige, aber irreversible Schädigung aufgetreten ist. Diese Kontraktionshemmung läßt sich anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve als eine nicht-kompetitive Hemmung beschreiben.

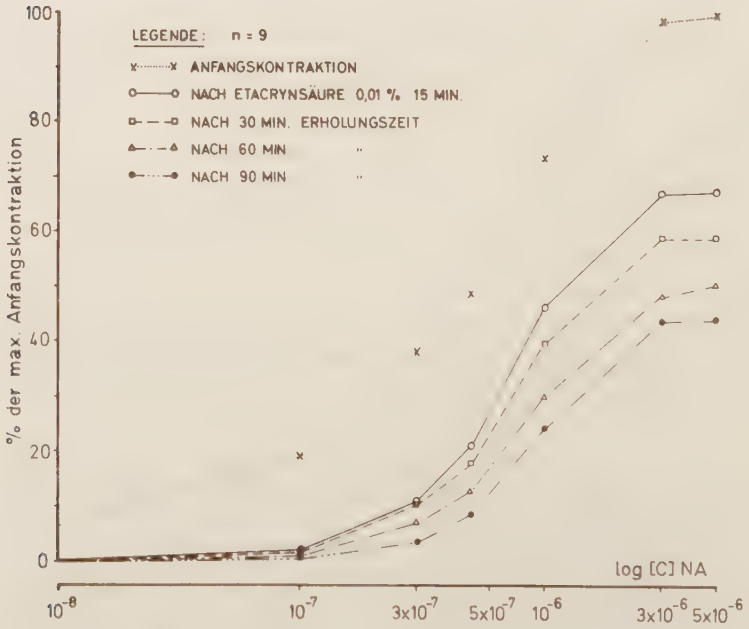


Abb. 5 : Dosis-Wirkungskurve für NA-Kontraktionen vor und nach Behandlung mit Etacrynsäure.

Aescin

Die Wirkung von Aescin wurde unter drei verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht:
1. Unmittelbar vor Setzen der Schädigung durch Polidocanol Vorbehandlung der Organe im Gefäßbad mit Aescin in 6 unterschiedlichen Konzentrationen.
2. In-vivo-Vorbehandlung der Ratten mit Aescin durch intraperitoneale Applikation eine halbe und 18 Stunden vor Präparation der Gefäße. Anschließend Schädigung mit Polidocanol im Gefäßbad.
3. Nach Ermittlung der optimalen Aescindosis (Resultat der unter 1. aufgeführten Versuchsreihen) Testung derselben bei Schädigung mit Etacrynsäure.
Zu 1.: Die untersuchten Aescinkonzentrationen lagen zwischen 0,0001 % und 0,005 % im Gefäßbad. Bei Anwendung von Polidocanol in einer Konzentration von 0,0015 % und 15 Minuten Einwirkzeit wurden die Kontraktionen der Gefäßstreifen nicht vollständig unterdrückt (ca. 10 % der maximalen Anfangskontraktion). Im Laufe der Erholungszeit verbesserte sich zudem die Kontraktilität. Es lag nahe, diese Konzentration zur Beurteilung der Aescinwirkung bei weiteren Versuchen heranzuziehen. Die Hemmung der Kontraktilität unmittelbar nach der Schädigung durch Polidocanol war bei den Aescinkonzentrationen von 0,0001 %, 0,00025 % und 0,0005 % weniger ausgeprägt. Im Laufe der Erholungszeit stellten sich zwei Konzentrationen als optimal heraus: 0,00025 % und 0,0005 %. Demgegenüber wurde nach Erhöhung der Dosis auf 0,005 % eine zusätzliche schädigende Wirkung durch Aescin erkennbar. Bei einigen dieser Versuche (Aescinkonzentrationen von 0,00025 %, $n = 6$ und 0,0005 %, $n = 4$) wurde die Erholungszeit auf 3 x 30 Minuten verlängert. Hier kehrte die maximale Kontraktion auf etwa 90 % der Ausgangslage zurück.

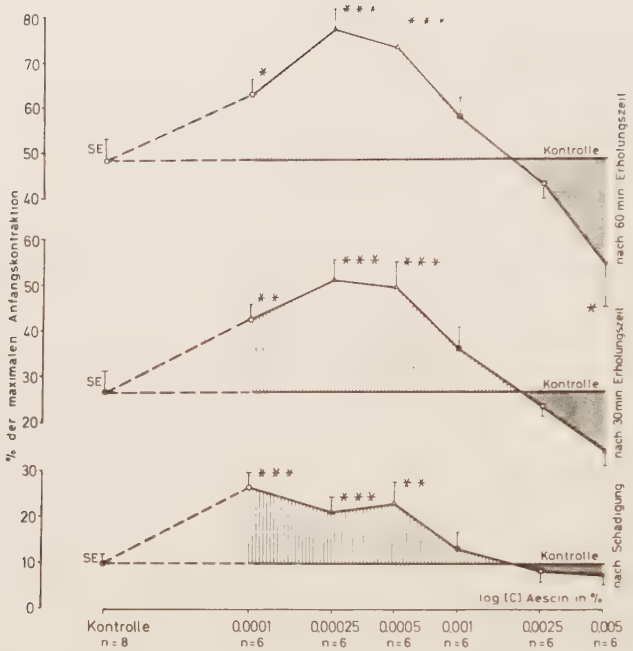


Abb. 6 : Verbesserung der Kontraktilität bei protektiver Gabe von Aescin vor Schädigung der Venenstreifen mit Polidocanol 0,0015 %, 15 min. * P < 0,05; * * P < 0,025; * * * P < 0,01.

Zu 2.: Trotz des unterschiedlichen Zeitpunktes der Vorbehandlung mit 3 mg/kg Aescin i.p. wurden in beiden Versuchsreihen annähernd gleiche Resultate erzielt. Wie aus der Abbildung 7 ersichtlich, vermag Aescin bei dieser Applikationsform die Schädigung durch Polidocanol zu vermindern.

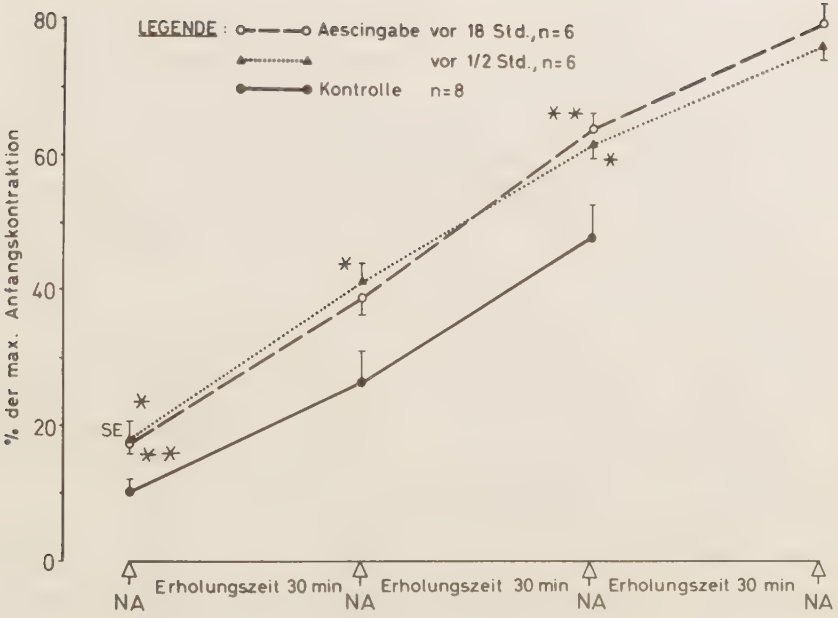


Abb. 7 : Verbesserung der Kontraktilität im Laufe der Erholungszeit nach i.p.-Vorbehandlung der Ratten mit Aescin 3 mg/kg und anschließender Schädigung der Venenstreifen mit Polidocanol 0,0015 %, 15 min.
* $P < 0,05$; ** $P < 0,025$.

Zu 3.: Im Unterschied zu Polidocanol schädigte Etacrynsäure die Gefäßstreifen irreversibel. Bei einer Konzentration von 0,01 % im Gefäßbad ist diese Schädigung nicht vollständig, nimmt jedoch im Laufe der Erholungszeit zu. Da bei einer kompletten Schädigung die Wirkung von Aescin schwer beurteilbar wäre, wurde die oben genannte Konzentration (0,01 %) für diese Versuchsreihe verwendet. Aus den unter 1. aufgeführten Versuchen ging hervor, daß Aescin in einer Konzentration von 0,00025 % die besten Resultate erbrachte. Deshalb wurden die Gefäßstreifen in den Versuchen mit Etacrynsäure mit dieser Dosis vorbehandelt.

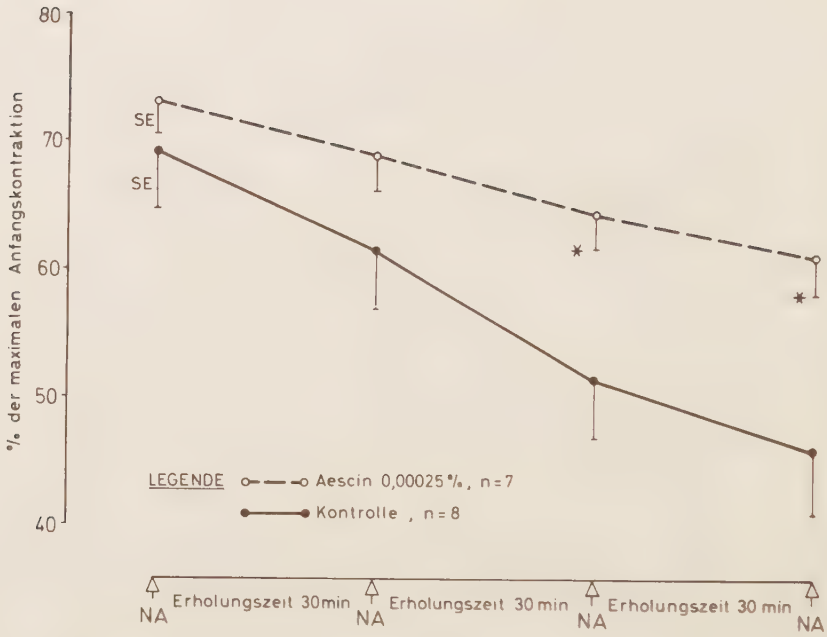


Abb. 8 : Verbesserung der Kontraktilität bei protektiver Gabe von Aescin mit anschließender Schädigung der Venenstreifen durch Etacrynsäure 0,01 %, 15 min. * $P < 0,05$.

Aescin vermochte zwar nicht die Schädigung durch Etacrynsäure zu verhindern, aber es schränkte das Ausmaß der Kontraktilitätshemmung ein, am deutlichsten sichtbar nach einer Erholungszeit von 3 x 30 Minuten.

Bei Vorbehandlung mit Aescin wurden Kontraktionen der Gefäße beobachtet. Diese traten bei Konzentrationen bis zu 0,0005 % nur vereinzelt auf, ab 0,001 % ≙ 10 µg/ml jedoch regelmäßig. Mit zunehmender Aescinkonzentration verstärkten sich die Spontanaktivität und die Kontraktionen, allerdings mit relativ großen Schwankungen innerhalb einer Versuchsgruppe. Nach

10 Minuten wurde Polidocanol 0,0015 % für 15 Minuten zugegeben. Daraufhin ging der Tonus auf den Ausgangswert zurück. Bei einer Aescinkonzentration von 0,005 % ≙ 50 µg/ml zeigte sich dann auch der schädigende Einfluß auf die Präparate in einer deutlich langsameren Erholung gegenüber der Kontrollgruppe und einer grösseren Streuung der Werte.

Aescin-konzentration in %	$\bar{x}$	SE	n
0,0001	0,3	0,3	6
0,00025	0,4	0,3	13
0,0005	2,3	1,7	6
0,001	30,2	8,6	6
0,0025	23,0	3,7	6
0,005	47,5	9,5	6

Tab. 1 : Größe der Kontraktion von Venenstreifen nach Gabe von Aescin in verschiedenen Konzentrationen. $\bar{x}$ in % der maximalen NA-Kontraktion.

Benzaron

Zur Anwendung kamen Gefäßstreifen der Aorta thoracica der Ratte. In Vorversuchen mit Polidocanol zeigte sich, daß dieses Pharmakon in einer Konzentration von 0,0075 % und 20 Minuten Einwirkungszeit die Kontraktilität der Aortenstreifen zwar weitgehend unterdrückte, diese jedoch nach einer Erholungszeit von 2 x 50 Minuten wieder eine Höhe von 57 % der maximalen Anfangskontraktion erreichte.

In der 1. Versuchsgruppe wurden die Organe mit Benzaron 0,00001 % 40 Minuten lang behandelt und anschließend durch Gabe von Polidocanol in der oben genannten Konzentration geschädigt.

Abb. 9 : Einfluß von Benzaron auf die Kontraktilität bei protektiver Gabe und anschließender Schädigung der Aortenstreifen mit Polidocanol 0,0075 %, 20 min. Entwicklung im Verlauf der Erholungszeit.

Es zeigte sich, daß Benzaron in der angegebenen Konzentration die Kontraktilität der Aortenstreifen nach der Schädigung nicht verbessern konnte.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in der 2. Versuchsgruppe der Einfluß von Benzaron auf gesunde Gefäße untersucht. Bei einer konstanten Einwirkzeit von 20 Minuten betrug die Benzaronkonzentration im Gefäßbad 0,01 % bzw. 0,001 %.

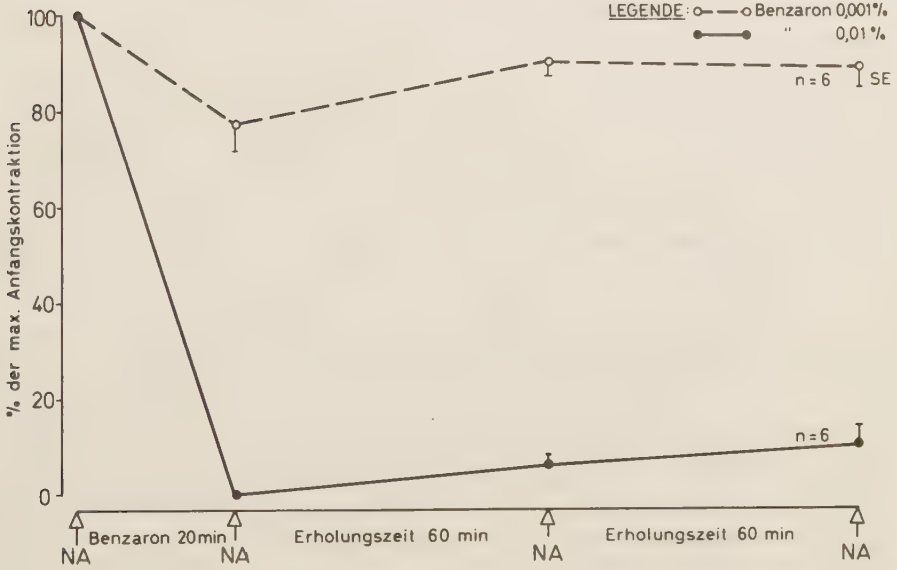


Abb. 10 : Einfluß von Benzaron in 2 verschiedenen Konzentrationen auf die Kontraktilität von Aortenstreifen und Entwicklung im Verlauf der Erholungszeit.

Nach Gabe von Benzaron in einer Konzentration von 0,01 % verschwindet die Reaktion der Gefäße auf NA zunächst vollständig und erreicht auch nach 2 Stunden Erholungszeit nur etwa 10 % der maximalen Anfangs-

kontraktion. Bei einer Konzentration von 0,001 % reduzierte sich die Maximalkontraktion nur auf etwa 77 %, stieg nach einer Stunde Erholungszeit auf 91 % an, verbesserte sich aber danach nicht mehr.

In der 3. Versuchsgruppe wurde der Einfluß der Einwirkdauer auf das Ausmaß der Schädigung untersucht.

Einwirkdauer / Zeitpunkt der Messung	n = 6 20 min		n = 6 40 min		n = 6 60 min	
	% der max. Anfangskontraktion	SE	% der max. Anfangskontraktion	SE	% der max. Anfangskontraktion	SE
unbehandelt	100		100		100	
nach Einwirkung von Benz.0,001 %	77,5	4,5	77,0	3,8	76,3	3,8
nach 60 min. Erholungszeit	90,7	1,9	89,8	4,6	92,0	5,7
nach 120 min. Erholungszeit	89,8	3,6	92,3	3,6	90,2	5,6

Tab. 2 : Einfluß der Einwirkdauer von Benzaron auf die Kontraktilität von Aortenstreifen.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ist bei der gewählten Benzaronkonzentration mit den verschiedenen Einwirkzeiten von 20, 40 und 60 Minuten kein wesentlicher Unterschied in der Kontraktionsfähigkeit festzustellen.

Anhand einer Dosis-Wirkungskurve läßt sich die Hemmung der NA-Kontraktion als nicht-kompetitiv beschreiben.

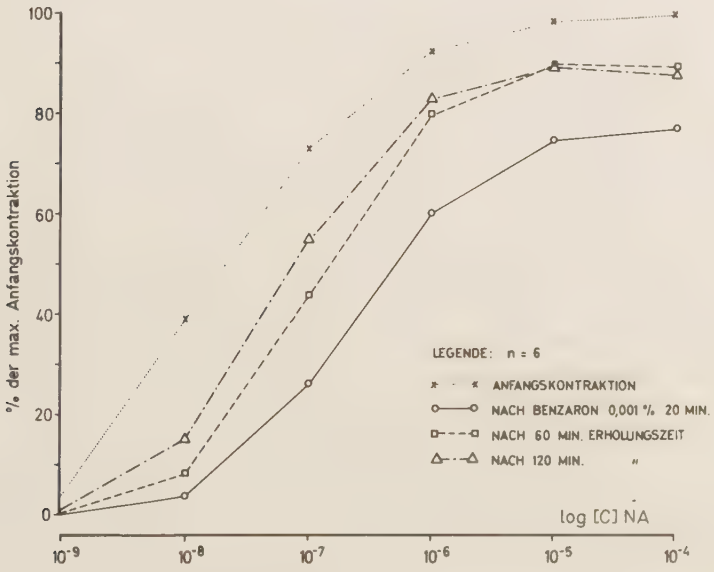


Abb. 11 : Dosis-Wirkungskurve für NA-Kontraktionen vor und nach Behandlung mit Benzaron.

Diskussion

Etacrynsäure

Etacrynsäure erwies sich in der Klinik als stark wirksames Diuretikum. Im Gegensatz zu den Benzothiadiazinen und ähnlich dem Furosemid wird neben der Natriumrückresorption auch der aktive Chloridtransport im aszendierenden Teil der Henleschen Schleife gehemmt. Daß die durch Etacrynsäure bedingte Hemmung des Chloridtransportes (50 % Hemmung bei 7×10^{-6} Mol Etacrynsäure) sich nicht nur an der Niere abspielt, konnten Motais et al. (2) in ihren Experimenten mit Ochsenerythrozyten nachweisen. Dabei fanden sie heraus, daß nicht nur die Chloridpermeabilität, sondern auch insgesamt die Anionenbewegung an der Zellmembran eingeschränkt wird. Diese Hemmung konnte jedoch durch Auswaschen beseitigt werden. Demgegenüber hatte Etacrynsäure in einer Konzentration von 10^{-3} Mol in Ochsenerythrozyten wenig Effekt auf den Natriumtransport.

Klahr et al. (3) untersuchten in ihren Arbeiten an der Rattenniere den Einfluß von Etacrynsäure auf die Glykolyse. Sie stellten eine Hemmung der Glykolyse fest, die proportional der Etacrynsäurekonzentration verlief. Diese Hemmung war nicht auswaschbar und beruht nach Ansicht der Autoren auf einer Reaktion mit Sulfhydrylgruppen (im Gegensatz zu den Untersuchungen von Motais et al. an Ochsenerythrozyten).

Einen weiteren Aspekt der Etacrynsäurewirkung zeigten Duggan et al. (4) in ihren Versuchen mit der Nierenrinde verschiedener Spezies auf. Sie wiesen eine konzentrationsabhängige Hemmung der "Na^+-K^+-Mg^{++}-abhängigen Membran-ATPase" nach. Zudem fanden sie heraus, daß sich mit der Dauer der Inkubation die etacrynsäurebedingte Hemmung noch weiter verstärkte.

Allerdings ist die Wirkung auf die eben erwähnte ATPase umstritten (5).

Petersen et al. (6) beschrieben eine Störung des aktiven Natriumtransportes an der Gallenblase des Meerschweinchens durch Etacrynsäure, möglicherweise bedingt durch eine Hemmung der Membran-ATPase. Anschließend führten sie eine histologische Untersuchung der geschädigten Gewebe durch. Etacrynsäure in einer Konzentration von 10^{-3} Mol verursachte einen Untergang der Epithelzellen, während bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol nur eine geringe Alteration in Form eines Zellödems sichtbar war.

In den hier vorliegenden Versuchen wurden die Gefäßstreifen nach Inkubation mit Etacrynsäure mehrfach kräftig durchgespült. Während bei einer Konzentration von 0,05 % ≙ $3{,}3 \times 10^{-3}$ Mol die Hemmung der Kontraktilität komplett und irreversibel war, zeigte sich bei 0,01 % ≙ $6{,}5 \times 10^{-4}$ Mol zunächst eine mäßige Hemmung, die jedoch im Laufe der Erholungszeit von 90 Minuten stark zunahm. Der zeitliche Verlauf der Kontraktilitätseinschränkung entsprach dem von Duggan et al. beschriebenen Verlauf der Membran-ATPase-Hemmung. Da ihr Vorhandensein in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden konnte (4,5), ist zu überlegen, ob sie auch in den glatten Muskelzellen der Gefäße vorhanden ist und hier einen Angriffspunkt der Etacrynsäure darstellt. Die Irreversibilität dieser Schädigung unterstützt die Ansicht einiger Autoren, daß die Etacrynsäure ihre Wirkung durch Reaktion mit Sulfhydrylgruppen von Enzymen (sei es die Membran-ATPase oder Enzyme der Glykolyse) entfaltet.

Bei der hier verwendeten Konzentration (0,01 % ≙ $6{,}5 \times 10^{-4}$ Mol) darf neben der Enzymhemmung auch eine Störung des Zellgefüges erwartet werden (6).Die mäßige,

aber irreversible Kontraktilitätseinschränkung bei dieser Konzentration diente als Grundlage für die Testung verschiedener Pharmaka auf ihre therapeutische Wirksamkeit.

Aescin

Die Wirksamkeit von Aescin wurde bisher unter anderem an verschiedenen Ödemmodellen überprüft. So fanden Vogel et al. (7) "eine Hemmwirkung vor allem für jene Ödeme, die das initiale Exsudationsstadium der Entzündung repräsentieren". Merkmal dieser Entzündungsphase ist neben der Erweiterung von Kapillaren und Venolen und der Emigration von Leukozyten vor allem eine Steigerung der Permeabilität von Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Diese Veränderung der Gefäßwandpermeabilität wird in erster Linie durch Bradykinin und Kallidin hervorgerufen. Vogel et al. konnten nun zeigen, daß Aescin eine durch Bradykinin bewirkte Permeabilitätssteigerung zu antagonisieren vermag. Demgegenüber war Aescin in jenen Modellen wirkungslos, die die reparative Spätphase, also die Bindegewebsneubildung, der Entzündung darstellen. Die Autoren schlossen daraus, "daß Aescin kapillarabdichtend wirkt und Zahl und/oder Durchmesser der kleinen Kapillarwandporen vermindert, durch die der Austausch von Wasser erfolgt". Weitere Versuche unterstützten diese Vermutung (8). Ebenso führten Arnold und Przerwa (9) die Hemmung eines Kälteödems des Großhirns und eines postischämischen Ödems der Muskulatur durch Aescin auf eine Permeabilitätsverminderung im Bereich der Venolen zurück.

Diese Wirkung auf die Permeabilität ist jedoch dosisabhängig. Toxische Konzentrationen führten über eine massive Hämolyse zum schnellen Tod der Versuchstiere (7). Außerdem konnte die Entwicklung eines proteinreichen Ödems durch Steigerung der Kapillarpermeabilität nach Aescingabe beobachtet werden, vermutlich aufgrund einer Zerstörung des Endothels (10). Als toxische Wirkung muß auch die

nicht auswaschbare und somit irreversible Kontraktion von Aortenstreifen angesehen werden, die bei Aescinkonzentrationen über 0,1 mg/ml auftrat (11). Konzentrationen von 5 bis 50 µg/ml bewirkten keine Kontraktion der Präparate. Die Autoren stellten daher fest,daß die Wirkung von Aescin nicht über eine Venentonisierung zu erklären ist.

Demgegenüber fanden Longiave et al. (12) eine Tonuserhöhung menschlicher Venen und von Portalvenen des Kaninchens bei einer Aescinkonzentration von 5 bis 10 µg/ml. Zudem wiesen sie eine Zunahme des Prostaglandins $PGF_{2\alpha}$ bei Gabe von Aescin und eine geringere Zunahme von PGE nach. $PGF_{2\alpha}$ hatte zwar in Untersuchungen von Kadowitz (13) keinen direkten Effekt auf den arteriellen Druck, vergrößerte aber die Reaktion der Vena saphena auf Stimulation durch sympathische Nerven und durch NA. Ducharme et al. (14) beschrieben eine Vasokonstriktion nach $PGF_{2\alpha}$-Gabe bei Ratten und Hunden.

Das Auftreten von Kontraktionen nach Aescingabe wird in den vorliegenden Versuchen bestätigt und korreliert mit der Eigentoxizität bei steigender Dosierung (bei einer Konzentration von 0,005 % ≙ 50 µg/ml). Demgegenüber liegt der Bereich für eine optimale protektive Wirkung zwischen 0,00025 % und 0,0005 % bzw. 2,5 µg/ml und 5 µg/ml.

Ausgehend von der Annahme, daß sich Aescin als oberflächenaktive Substanz nur extrazellulär verteilt und in Anlehnung an die bei isolierten Gefäßen ermittelte optimale Dosis, wurde die für die Vorbehandlung von Ratten (intraperitoneale Applikation) nötige Dosierung auf 3 mg/kg festgelegt. Die Tatsache, daß trotz verschiedener Zeitpunkte der Vorbehandlung keine unterschiedlichen Ergebnisse auftraten und die Tatsache, daß sich diese Ergebnisse in die in vitro gewonnenen Resultate einordnen lassen, sprechen dafür, daß Meta-

bolite des Aescins für seine spezifische Wirkung keine Rolle spielen.

Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise Aescin seine protektiven Eigenschaften entfaltet. Aufgrund der bislang bekannten Erkenntnisse und der hier vorliegenden Ergebnisse wären folgende Möglichkeiten denkbar:

1. Etacrynsäure verursacht eine Schädigung in geringen Dosierungen vermutlich durch Eingriff in den Zellstoffwechsel, in höheren Dosierungen durch Zerstörung der Zelle. Beide Wirkungen könnten bei der hier verwandten Dosierung zum Tragen kommen. Polidocanol hingegen schädigt die Zelle unspezifisch, sei es an der Zellmembran, sei es an den intrazellulären Strukturen (15). Trotz unterschiedlicher Wirkungsweise dieser beiden Substanzen zeigt nun Aescin eine vergleichbare protektive Wirkung. Dies wäre erklärbar durch einen nicht nur kapillar-, sondern allgemein "membranabdichtenden" Effekt. Aescin würde somit den Zugang schädigender Substanzen zur Zellmembran und in das Zellinnere verhindern. Andererseits wäre auch eine "Membranstabilisierung" denkbar und eine daraus folgende zunehmende "Resistenz" gegenüber schädigenden Einflüßen von außen (z.B. durch eine Erhöhung der Permeabilität durch Bradykinin oder PGE). Interessant ist in diesem Zusammenhang die von Dunn (16) aufgestellte Hypothese, daß bei einer Entzündung PGE die angestiegene vaskuläre Permeabilität vergrößert, während PGF anschließend diese wieder hemmt.

2. Die durch Aescin verursachte Erhöhung der $PGF_{2\alpha}$-Produktion und -Ausschüttung führt zu einer Steigerung der Kontraktionsbereitschaft der Venenpräparate. Es kommt infolgedessen trotz Schädigung zu größeren Kontraktionen nach NA-Gabe, indem nicht oder nur teil-

weise geschädigte kontraktile Strukturen zu verstärkten Kontraktionen angeregt werden.
3. Auch ein Zusammenwirken beider Möglichkeiten wäre denkbar.

Es bleibt festzuhalten, daß in den vorliegenden Versuchen eine Aescinkonzentration, die gerade eben noch selbst Kontraktionen verursacht (0,001 %), schon über dem optimalen Dosisbereich liegt, während eine weitere Steigerung der Konzentration zu einer zusätzlichen Schädigung führt. Ob nun Aescin direkt Kontraktionen auszulösen vermag oder ob $PGF_{2\alpha}$ eine Vermittlerrolle spielt, bleibt ungeklärt.

Benzaron

Das Anwendungsgebiet von Benzaron erstreckt sich auf die Prophylaxe und Behandlung der chronisch venösen Insuffizienz und thrombophlebitischen Geschehens. Während einige Eigenschaften des Benzarons schon lange bekannt sind, ist die Wirkungsweise im einzelnen nicht restlos aufgeklärt.

In ihren Untersuchungen konnten Barchewitz (17), und auch Goethals (18) "eine Begünstigung der Fibrinolyse im Bereich der Wand der Vena saphena beim varikösen Patienten" durch oral appliziertes Benzaron feststellen.

Charlier (19) berichtete über eine Normalisierung der durch eine Vitamin-P-Mangeldiät hervorgerufenen Kapillarfragilität nach intraperitonealer Behandlung mit Benzaron. Auch eine pathologisch gesteigerte Kapillarpermeabilität ging dosisabhängig zurück.

Felix und Hällfritzsch (20) testeten die Benzaronwirkung am Chloroformödem der Maus. Sie fanden heraus, daß die antiödematöse Wirkung hauptsächlich auf einer Hemmung des Proteinübertritts beruht. Felix (21) konnte diese Hemmung des Proteinübertritts auch am Polidocanol- und Thiopentalödem des Katzenhinterlaufs bestätigen.

Mit dem Effekt von Benzaron auf den Stoffwechsel von arteriellem Gewebe und arteriellen glatten Muskelzellkulturen befaßten sich Filipovic und Buddecke (22). In einer Konzentration von 8 µg/ml hatte Benzaron keinen Einfluß auf die Aufnahme und Abgabe von LDL, jedoch war die Inkorporation von Acetat und Palmitat in die Gesamtlipide der glatten Muskelzelle gesteigert. Bei zehnfach höherer Dosierung stieg der Glukoseverbrauch an, obwohl die Lipid- und Proteinbiosynthese herabgesetzt war.

Daß Benzaron die Wirkung von endogenen Aminen

(am stärksten Histamin, Acetylcholin und Bradykinin) zu "antagonisieren" vermag, stellte Charlier (19) bei in-vitro-Versuchen fest. Ähnliche Ergebnisse erhielten Betz und Eitel (23) an Piaarterien. Sie nahmen an, daß Benzaron seine Wirkung entfaltet, entweder, indem es Calcium als Kontraktionsvermittler hemmt, oder, indem es direkt am Aktin oder Myosin angreift.

Diese "Antagonisierung" von Calcium kann aufgrund der hier vorliegenden Versuche nicht bestätigt werden. Nach Inkubation der Organe wurde Benzaron aus dem Gefäßbad ausgespült und auch während der Erholungszeit die Krebs-Henseleit-Lösung mehrfach erneuert. Trotz ausreichendem Calciumangebot in dieser Lösung erreichten die Kontraktionen der Gefäße nicht mehr das Ausgangsniveau (Benzaron 0,01 % ≙ 100 µg/ml: nach 2 x 1 Stunde Erholungszeit 10 % der maximalen Abfangskontraktion; Benzaron 0,001 % ≙ 10 µg/ml: nach einer und 2 x 1 Stunde Erholungszeit je circa 90 %).

Nachdem Benzaron in den Versuchen von Felix und Hällfritzsch (20) eine stärkere Ödemhemmung als Aescin zeigte und Aescin auch an isolierten Organen seine protektive Wirkung entfaltete (siehe Ergebnisse und Diskussion von Aescin), lag es nahe, auch Benzaron unter diesen Bedingungen zu testen. Broekhuysen (24) hatte bei der üblichen therapeutischen Dosierung von 100 mg oral einen maximalen Plasmaspiegel von 1 µg/ml ≙ 0,0001 % Benzaron ermittelt. Bei gleicher Konzentration im Gefäßbad und anschließender Schädigung mit Polidocanol zeigte sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorversuchen eine verstärkte Hemmung der Kontraktilität gegenüber der Kontrollgruppe. Eine um eine Zehnerpotenz niedrigere Konzentration erbrachte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Um eine Interaktion mit

Polidocanol auszuschließen wurden nun die Gefäße mit 0,001 % Benzaron allein inkubiert. Eine dosisabhängige Hemmung der NA-Kontraktion wurde deutlich. Das Bestehenbleiben dieser Hemmung trotz wiederholtem Ausspülen widerspricht den Ansichten von Charlier (19) und Betz und Eitel (23), Benzaron "antagonisiere" NA bzw. Calcium. Es ist also eher anzunehmen, daß es direkt auf die kontraktilen Strukturen der glatten Muskelzellen wirkt.

Benzaron vermochte nicht in den hier angewandten Konzentrationen die glatte Muskelzelle zu schützen, obwohl seine protektive Wirkung am Polidocanolödem des isoliert perfundierten Hinterlaufs der Katze deutlich war. Die guten klinischen Erfahrungen lassen sich also nur durch die schon bisher bekannten Effekte auf die Fibrinolyse und das Kapillarendothel erklären. Inwieweit dies auf Benzaron selbst oder seine Metabolite zurückzuführen ist, bleibt offen.

Literaturverzeichnis

1) Pharmacological Experiments on Isolated Preparations, E. & S. Livingstone LTD., Edinburgh, (1968)
2) R.Motais, J.L.Cousin, Amer. J. Physiol., 231, 1485, (1976)
3) S.Klahr, J.Yates, J.Bourgoignie, Amer. J. Physiol., 221, 1038, (1971)
4) D.E.Duggan, R.M.Noll, Arch. Biochem., 109, 388, (1965)
5) A.Schwartz, G.E.Lindenmayer, J.C.Allen, Pharmacol. Rev., 27, 3, (1975)
6) K.-U.Petersen, K.Heintze, L.C.Busch, O.Heidenreich, Arch. Pharm., 309, 287, (1979)
7) G.Vogel, M.L.Marek, R.Oertner, Arzneimittel-Forsch., 20, 699, (1970)
8) M.Rothkopf, G.Vogel, Arzneimittel-Forsch., 26, 225, (1976)
9) M.Arnold, M.Przerwa, Arzneimittel-Forsch., 26, 402, (1976)
10) W.Felix, J.Remien, Arzneimittel-Forsch., 26, 402, (1976)
11) H.Lochs, H.Baumgartner, H.Konzett, Arzneimittel-Forsch., 24, 1347, (1974)
12) D.Longiave, C.Omini, S.Nicosia, F.Berti, Pharmacol. Res. Commun., 10, 145, (1978)
13) P.J.Kadowitz, C.S.Sweet, M.J.Brody, J. Pharmacol., exp. Ther., 176, 167, (1971)
14) D.W.DuCharme, J.R.Weeks, Fed. Proc., 26, 681, (1967)
15) P.Eichler, Zur Wirkung von HR auf die durch Polidocanol und Etacrynsäure geschädigten isolierten Pfortadern und Aorten der Ratte, Veröffentlichung in Vorbereitung

16) in: J.R.Vane, S.H.Ferreira, Handb. exp. Pharmacol., 50/I, 257, (1978)
17) G.Barchewitz, in: Ergebnisse der Angiologie, 11, 119, Schattauer Stuttgart, (1975)
18) J.Goethals, in: Ergebnisse der Angiologie, 11, 125, Schattauer Stuttgart, (1975)
19) R.Charlier, in: Ergebnisse der Angiologie, 11, 109, Schattauer Stuttgart, (1975)
20) W.Felix, K.Hällfritzsch, Arzneimittel-Forsch., 28, 2297, (1978)
21) W.Felix, Arzneimittel-Forsch., 28, 2300, (1978)
22) I.Filipovic, E.Buddecke, Arzneimittel-Forsch., 29, 1578, (1979)
23) E.Betz, W.Eitel, Arzneimittel-Forsch., 28, 626, (1978)
24) J.Broekhuysen, in: Ergebnisse der Angiologie, 11, 97, Schattauer stuttgart, (1975)

Bei Herrn Prof. Dr. W. Felix möchte ich mich herzlich bedanken für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Hinweise und die verständnisvolle Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Für die freundliche und tatkräftige Hilfe bei der Versuchsdurchführung möchte ich Frau Steigerwald und Frau Schubert danken.

Lebenslauf

von Hans-Jürgen Backhaus geboren am 28.2.52 in Kelheim

Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1958 - 1962	Besuch der Volksschule an der Turnerstrasse in München
1962 - 1971	Besuch des Wilhelms-Gymnasiums in München
1971	Abitur
1971 - 1972	Pädagogik-Studium an der Universität München
1972 - 1973	Zivildienst
1973 - 1974	Physik-Studium an der Universität München
1974 - 1980	Studium der Humanmedizin an der Universität München
1980	Staatsexamen und Approbation
seit 1981	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Wolfratshausen